

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

分担研究者： 徳永 勝士 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学 教授
研究協力者： 西田 奈央、川嶋 実苗、澤井 裕美、馬渡 頼子、提嶋 恵美

分担研究課題：ゲノムワイド関連分析による肝炎の宿主遺伝要因の探索

研究要旨:肝炎ウイルスに感染した宿主側の病態促進因子及び薬剤応答性を規定する遺伝要因の解明を目的として、90万種類以上のSNPを対象としたゲノムワイド関連分析を実施した。今年度は、慢性ウイルス性肝疾患患者群（うつ病、扁平苔癬群）277検体を追加してタイピングした。これまでに解析した全慢性ウイルス性肝疾患患者群1,437検体のうち、1,339検体でQC call rateが95%以上となり、Overall call rateの平均は98.74%となった。C型肝炎に対する標準治療であるPeg-IFN α +RBV併用療法の副作用であるうつ症状の発症に関して、ゲノムワイド有意水準と同程度の関連を示す遺伝子領域を検出した。また、HCV関連の扁平苔癬に関連する遺伝子領域として、HLA-DR遺伝子が再現された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスに感染した宿主を対象としたゲノムワイド関連分析を行うことにより、宿主側の肝病態進展に寄与する遺伝因子、治療効果に寄与する遺伝因子、ウイルス感染感受性に寄与する遺伝因子を探索することを目的とする。

B. 研究方法

90万種以上のSNP解析用プローブが搭載されたAffymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0（以下、SNP Array 6.0）を用いて、慢性ウイルス性肝疾患患者群を対象としたSNPタイピングを行い、患者群を病態および薬剤応答性に応じてサブグループに分類してゲノムワイド関連分析を行う。

本研究では、ゲノムワイド関連分析で検出された候補遺伝子領域に対して、2次パネルを用いた再現性確認実験（Replication study）を実施す

ることにより、疾患感受性遺伝子の同定を目指した（図1）。

ゲノムワイド関連分析における擬陽性関連の発生を効果的に抑えるために、以下の手順でSNP filteringを実施する：(1)QC call rateが95%以上となったタイピングデータを選択する。(2)対象群と対照群を合わせてGenotyping Console

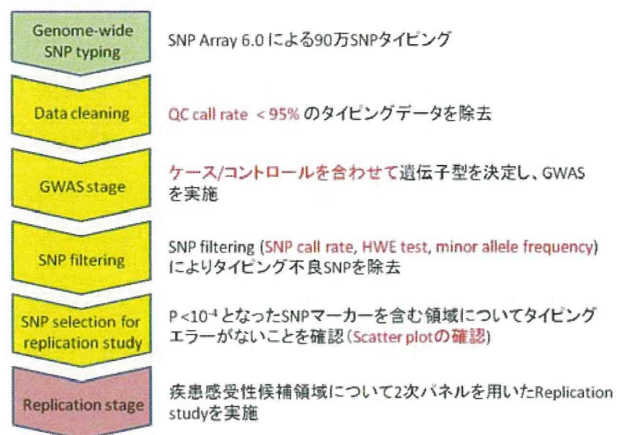


図 1 GWASの実施手順

ver4 ソフトウェアによる遺伝子型を決定する。
 (3) SNP Array 6.0 に搭載された全 90 万 SNP の中に含まれる、日本人では頻度が低く統計解析に不適切な SNP やタイピング精度の低い SNP を除去する。
 (4) 統計解析の結果から P 値 $< 10^{-4}$ となった SNP についてタイピング生データである散布図を確認し、擬陽性関連が疑われる SNP を除去する。
 ゲノムワイド関連分析は、われわれが開発した GeneChip analysis ver2.0.10 ソフトウェアを用いて実施する。ゲノムワイド関連分析で検出された疾患感受性候補遺伝子領域において、HapMap データを用いた連鎖不平衡解析から TagSNP を選択し、DigiTag2 法を用いた Replication study を実施する。解析対象となる SNP の遺伝子型を決定するためのソフトウェアとして、われわれは SNP Star ver0.0.1.0 ソフトウェアを開発した。決定された遺伝子型に基づいて、アリル頻度、遺伝子型頻度、劣性モデル、優性モデルの 4 つの統計解析結果を得る。

C. 研究結果

本年度は慢性ウイルス性肝疾患患者 277 検体を追加して SNP Array 6.0 を用いてタイピングした。これまでに取得したデータと合わせた患者群合計 1,437 検体のうち、1,339 検体は QC call rate が 95% 以上となり、Overall call rate の平均は 98.74% となった。

本年度は、Peg-IFN α +RBV 併用療法でうつ症状を発症した患者群 (199 検体) およびうつ症状を発症しなかった患者群 (431 検体) のサンプル収集を集中的に実施した。BDI テスト (ベックのうつ病調査表) で 14 点以上 (軽いうつ状態)、および 20 点以上 (うつ状態) となった、それぞれ 70 検体と 45 検体に対して、うつ症状を発症しなかった群 156 検体、180 検体を比較対照群とした GWAS

を実施した。2 段階の GWAS でオッズ比が強まった領域を選択することでうつ病発症の候補遺伝子領域の絞り込みを行った。

選択された 96 種の SNP について、160 検体 (BDI テストで 20 点以上が 40 検体、20 点以下が 120 検体) を用いた Replication 解析を実施した結果 (図 2)、 $P = 8.57 \times 10^{-8}$ (OR = 2.54) に達する SNP を同定した。

また、HCV による扁平苔癬に関しても、検体を追加収集し、HCV による扁平苔癬群 99 検体と扁平苔癬なし群 155 検体について、ゲノムワイド関連解析を実施した。ゲノムワイド有意水準 ($P = 8.34 \times 10^{-8}$) に達する SNP を含む遺伝子領域は検出できなかったが、 $P < 10^{-4}$ を示す 65SNPs が存在する全 32 個所の候補遺伝子領域を検出した。

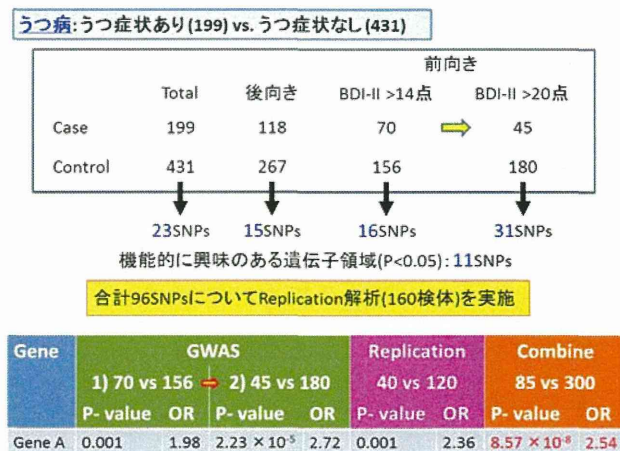


図 2 うつ病を対象とした GWAS 結果

D. 考察

うつ病を対象とした GWAS では、ゲノムワイド有意水準 ($P = 7.84 \times 10^{-8}$) とほぼ同じ強さの関連を示す SNP を検出することができた。しかしながらうつ病を発症した GWAS サンプルは 45 例、Replication サンプルは 40 例と非常にサンプルサイズが小さいため、擬陽性関連である可能性がぬぐいきれない。収集した日本人サンプルはすべて解析に用いたため、東アジアや東南アジアの解

析データを追加し、アジア集団において関連が再現されるかを確認する必要がある。

HCV 関連の扁平苔癬については、これまでに収集した扁平苔癬群 99 例と扁平苔癬なし群 155 例のすべてを使用して GWAS を実施した。これまでに HCV 関連の扁平苔癬との関連が報告されている HLA-DR 遺伝子領域から、 $P < 10^{-4}$ となる SNP を検出した。

E. 結論

うつ病に関しては、関連が検出された SNP について、日本人以外の東アジア・東南アジアの研究協力者などにデータの追加を依頼し、アジア集団において関連が再現されるかを確認する必要がある。アジア集団での関連が再現されれば、Peg-IFN α +RBV 併用療法によるうつ症状発症の関連遺伝子として世界で初の報告となる。

また、扁平苔癬については、本研究班で収集したすべての検体を用いて GWAS を実施したために Replication 解析に用いる検体を新たに追加する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nishida N, Mawatari Y, Sageshima M, **Tokunaga K**. Highly parallel and short-acting amplification with locus-specific primers to detect single nucleotide polymorphisms by the DigiTag2 assay. PLoS One 7(1): e29967, 2012.

(2) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, **Tokunaga K**. No association for

Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian

populations. BMC Med. Genet. 13(1): e47, 2012.

(3) Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, **Tokunaga K**, Mizokami M. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. PLoS One 7(6): e39175, 2012.

(4) Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, **Tokunaga K**, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, and Matsuda K: Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. PLoS One 7(9): e44743, 2012.

(5) Kawashima M, Ohashi J, Nishida N, **Tokunaga K**. Evolutionary Analysis of Classical HLA Class I and II Genes Suggests That Recent Positive Selection Acted on DPB1*04:01 in Japanese Population. PLoS One 7(10): e46806, 2012.

(6) Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, **Tokunaga K**, Mizokami M, and Izumi N: Model

incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. J Med Virol. 85(3): 449-58, 2013.

2. 学会発表

(1) **Tokunaga K**: Genome-wide approaches to complex disease: advances and perspectives, Genomic Analysis of Diseases Workshop, Nature Conference, Hangzhou, China, 2012. 5.

(2) **徳永勝士**: 基調講演: 疾患関連遺伝子のゲノム全域探索の現状と展望、「ワークショップ: 最近の遺伝子研究からみた肝臓病の現状と個別化医療への展望」第48回日本肝臓学会総会、金沢、2012. 6.

(3) 西田奈央、田中靖人、澤井裕美、杉山真也、馬渡頼子、**徳永勝士**、溝上雅史、日本人および韓国人におけるB型肝炎慢性化、B型肝炎ウイルス排除を規定するHLA-DP遺伝子の同定、第16回日本肝臓学会大会、神戸、2012. 10.

(4) Nishida N, Tanaka Y, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Koike A, Matsuura K, Sugiyama M, Murata K, Korenaga M, Masaski N, Han KH, **Tokunaga K**, Mizokami M, The associations of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance are widely replicated in East-Asian populations, 61th Annual ASHG Meeting, San Francisco, 2012. 11.

(5) **Tokunaga K**: Genome-wide Search for disease genes and drug response genes: Implications and perspectives, The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry ISNAC2012, 名古屋, 2012. 11.

(6) Nishida N, Tanaka Y, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Matsuura K, Sugiyama M, Murata K, Korenaga M, Masaski N, Han KH, **Tokunaga K**, Mizokami M, Meta-analysis identifies the

association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance widely in East-Asian populations, American Association for the Study of Liver Diseases The Liver Meeting 2012, Boston, 2012. 11.

(7) Nishida N, Tanaka Y, Sugiyama M, Mawatari Y, Ishii M, **Tokunaga K**, Mizokami M, Investigating the novel host genetic factors associated with treatment response for HCV patients, The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science", KEIO Plaza Hotel, 2012. 11.

(8) 馬渡頼子、西田奈央、中伊津美、**徳永勝士**、溝上雅史、DigiTag2法におけるPCRプライマー設計パラメータの検証、第35回日本分子生物学会年、福岡、2012. 12.

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

分担研究者：溝上 雅史 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター
センター長

分担研究課題：次世代シーケンサーを用いた IL28B の解析

研究要旨：IL28Bの一塩基多型を判定することでC型慢性肝炎のインターフェロン治療の成績を予測できるが、高齢女性で特にこの予測から外れることが知られている。高齢という集団の特性からDNAメチル化の影響が疑われたため、高速シーケンサーでの全ゲノムメチル化領域の解析を実施した。ケースコントロール研究を行い、全ゲノムを比較して治療効果と関連の有る領域を抽出した。その結果、治療無効と関連するメチル化部位を52箇所同定し、治療反応性と関連する部位を271箇所同定した。同部位について、バリデーション集団として独立した患者群を用いてリアルタイムPCRでの検証を実施している。また、血清を用いた検査でインターフェロン治療の予測向上を目指して、血中のIL28Bを定量する実験系の構築を行い、治療予測効率を改善させ、最大で97.6%まで向上させた。

A. 研究目的

IL28B の一塩基多型による治療予測から外れる患者群に対して、より精度を向上させるための因子を探索する。

B. 研究方法

同意のとれた患者からゲノム DNA と PBMC を取得した。ゲノム DNA はメチル化部位の探索を行うために、断片化後に DNA メチル化部位の回収を行った。それらを高速シーケンサーである GA2x で解析した。得られた配列は、全ゲノム上にマッピングし、治療反応性群と治療無効群で比較し、差のある領域を抽出した。

PBMC は細胞培養を行い、インターフェロンと TLR7 リガンドを処理した後に上清を回収した。回収した上清は以前研究室内で樹立した化学発

光系の IL28B 特異的な CLEIA で定量した。

C. 研究結果

高速シーケンサーで全ゲノム領域のメチル化を解析した。得られたデータの解析手法の検討を行い、単点でのケースコントロール解析を実施した。その結果、治療無効群に関連を示すメチル化部位として 52 領域を同定した。また、治療反応性群に関連を示すメチル化部位として 271 箇所を同定した。同部位について、バリデーション集団として独立した患者群を用いてリアルタイム PCR での検証を実施している。

また、PBMC を用いて IL28B の発現量をモニターすることで治療前にその効果を予測できないか検討した。取得した PBMC に薬剤で刺激するこ

とで IL28B の蛋白レベルを培養上清で測定した。IL28B 特異的な抗体で CLEIA による定量を実施したところ、治療反応性群では、治療無効群と比較して有意に IL28B の発現量が高かった ($p < 0.0005$)。IL28B の SNP で分類しても同様であり ($p < 0.04$) あった。SNP での治療効果予測と IL28B の蛋白レベルでの予測を比較したところ、それぞれ 63.4%と 97.6%であり、蛋白レベルで判定する場合に予測効率が高かった。

D. 考察

C 型慢性肝炎の治療効果の予測においては、遺伝要因である SNP だけでも有効であるが、そこにエピゲノム要因と最終産物である IL28B 蛋白レベルの測定を加える事でより正確に判定できることが示唆された。

E. 結論

遺伝、非遺伝要因 (エピゲノム)、蛋白の各要素を組み合わせることでより正確な治療効果予測が可能となると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kumar V, Yi Lo P H, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, **Mizokami M**, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K.

Soluble MICA and a MICA Variation as Possible Prognostic Biomarkers for HBV-Induced Hepatocellular Carcinoma.

PLoS One 7 (9):e44743, 2012.

2. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn S H, Park J Y, Hige S, Kang J H, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M,

Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han K H, Tanaka Y, Tokunaga K, **Mizokami M**.

Genome-Wide Association Study Confirming Association of HLA-DP with Protection against Chronic Hepatitis B and Viral Clearance in Japanese and Korean.

PLoS One 7 (6):e39175, 2012.

3. Zhou B, Wang Z, Yang J, Sun J, Li H, Tanaka Y, **Mizokami M**, Hou J.

Novel evidence of HBV recombination in family cluster infections in Western china.

PLoS One 7 (6):e38241, 2012.

4. Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, **Mizokami M**, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T.

Production of infectious chimeric hepatitis C virus genotype 2b harboring minimal regions of JFH-1. J Virol 86 (4):2143-52, 2012.

5. Nakano T, Lau G M, Sugiyama M, **Mizokami M**. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. Liver Int 32 (2):339-45, 2012.

6. Raghwan J, Thomas X V, Koekkoek S M, Schinkel J, Molenkamp R, van de Laar T J, Takebe Y, Tanaka Y, **Mizokami M**, Rambaut A, Pybus O G. Origin and evolution of the unique hepatitis C virus circulating recombinant form 2k/1b. J Virol 86 (4):2212-20, 2012.

J Virol 86 (4):2212-20, 2012.

7. Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Onozuka I, Azuma S, Kakinuma S, Nitta S, Kiyohashi K, • A K-K, Murakawa M,

- Yoshino K, Itsui Y, Tanaka Y, **Mizokami M**, Watanabe M, Group t O-L C S. Association of ITPA gene variation and serum ribavirin concentration with a decline in blood cell concentrations during pegylated interferon-alpha plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *hepatol Int*, 2012.
8. Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, Murakami S, Attia F M, Hassan A A, Hassan M F, Shedid M M, Abdel Reheem H B, Khan A, **Mizokami M**. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. *J Med Virol* 84 (4):587-95, 2012.
9. Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Shimazu T, Yamaji T, Takachi R, Tanaka Y, **Mizokami M**, Tsugane S. Consumption of n-3 Fatty Acids and Fish Reduces Risk of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 142 (7):1468-75, 2012.
10. Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang J H, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn S H, Han K H, Park J Y, Yuen M F, Nakamura Y, Tanaka Y, **Mizokami M**, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet* 13 (1):47, 2012.
11. Miyagi Y, Nomura H, Yamashita N, Tanimoto H, Ito K, Masaki N, **Mizokami M**, Shibuya T. Estimation of two real-time RT-PCR assays for quantitation of hepatitis C virus RNA during PEG-IFN plus ribavirin therapy by HCV genotypes and IL28B genotype. *J Infect Chemother*, 2012.
12. Michikawa T, Inoue M, Sawada N, Iwasaki M, Tanaka Y, Shimazu T, Sasazuki S, Yamaji T, **Mizokami M**, Tsugane S. Development of a prediction model for 10-year risk of hepatocellular carcinoma in middle-aged Japanese: the Japan Public Health Center-based Prospective Study Cohort II. *Prev Med* 55 (2):137-43, 2012.
13. Nomura H, Miyagi Y, Tanimoto H, Yamashita N, Ito K, Masaki N, **Mizokami M**. Increase in platelet count based on inosine triphosphatase genotype during interferon beta plus ribavirin combination therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 27 (9):1461-6, 2012.
14. Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, **Mizokami M**, Wakita T. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol* 86 (19):10805-20, 2012.
15. Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, **Mizokami M**. LecT-hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 56 (4):1448-56, 2012.
16. Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y,

- Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, **Mizokami M**, Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 42 (10):958-965, 2012.
17. Nakamura M, Nishida N, Kawashima M, Aiba Y, Tanaka A, Yasunami M, Nakamura H, Komori A, Nakamura M, Zeniya M, Hashimoto E, Ohira H, Yamamoto K, Onji M, Kaneko S, Honda M, Yamagiwa S, Nakao K, Ichida T, Takikawa H, Seike M, Umemura T, Ueno Y, Sakisaka S, Kikuchi K, Ebinuma H, Yamashiki N, Tamura S, Sugawara Y, Mori A, Yagi S, Shirabe K, Taketomi A, Arai K, Monoe K, Ichikawa T, Taniai M, Miyake Y, Kumagi T, Abe M, Yoshizawa K, Joshita S, Shimoda S, Honda K, Takahashi H, Hirano K, Takeyama Y, Harada K, Migita K, Ito M, Yatsuhashi H, Fukushima N, Ota H, Komatsu T, Saoshiro T, Ishida J, Kouno H, Yagura M, Kobayashi M, Muro T, Masaki N, Hirata K, Watanabe Y, Nakamura Y, Shimada M, Hirashima N, Komeda T, Sugi K, Koga M, Ario K, Takesaki E, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Tsubouchi H, **Mizokami M**, Nakanuma Y, Tokunaga K, Ishibashi H. Genome-wide Association Study Identifies TNFSF15 and POU2AF1 as Susceptibility Loci for Primary Biliary Cirrhosis in the Japanese Population. *Am J Hum Genet* 91 (4):721-728, 2012.
18. Sugiyama M, Kimura T, Naito S, Mukaide M, Shinauchi T, Ueno M, Ito K, Murata K, **Mizokami M**. Development of specific and quantitative real-time detection PCR and immunoassays for lambda3-interferon. *Hepatology* 42 (11):1089-99, 2012.
19. Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsuhashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, **Mizokami M**. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon-alpha in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut*, 2012.
20. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, **Mizokami M**, Takehara T. Human BDCA3(+) dendritic cells are a potent producer of IFN-lambda in response to hepatitis C virus. *Hepatology*, 2012.
2. 学会発表
国際学会
1. Ito K, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, **Mizokami M**. Risk factors for long-term persistence of serum hbsag following acute hepatitis B virus infection in Japan. APASL2012 : 22nd conference of the Asian Pacific association for the study of the liver Taipei, Taiwan, 2012.02.16-19
Poster.
2. Kirikae I, Ito K, Mukaide M, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, **Mizokami M**. Ultrasensitive assay for genotyping of hepatitis B virus by use of an automated DNA extraction instrument. APASL2012 : 22nd conference of the Asian Pacific association for the study of the liver Taipei, Taiwan, 2012.02.16-19

Poster.

3. Masaki N, Shrestha P, Nishimura S, Ito K,

Mizokami M.

Present status and future perspectives of treatment of chronic hepatitis B in Nepal.

APASL2012 : 22nd conference of the Asian Pacific association for the study of the liver Taipei, Taiwan, 2012.02.16-19

Poster.

4. Matsuura K, Tanaka Y, Nishida N, Kurosaki M, Sakamoto A, Enomoto N, Yatsuhashi H, Kaneko S, Tokunaga K, **Mizokami M.**

ITPA gene variants associated with hemolytic anemia and treatment efficiency in pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C

APASL2012 : 22nd conference of the Asian Pacific association for the study of the liver Taipei, Taiwan, 2012.02.16-19

Poster.

5. Nishida N, Sawai H, Sugiyama M, Matsuura K, Han K-H, Koike A, Ahn S H, Tokunaga K, Tanaka Y, **Mizokami M.**

The association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean APASL2012 : 22nd conference of the Asian Pacific association for the study of the liver Taipei, Taiwan, 2012.02.16-19

Poster.

6. Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Azuma S, Tanaka Y, **Mizokami M.**, Watanabe M.

ITPA gene variant protects against treatment-induced anemia and improves viral clearance by pegylated interferon-alfa and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients APASL2012 : 22nd conference of

the Asian Pacific association for the study of the liver Taipei, Taiwan, 2012.02.16-19

Poster.

7. Sawai H, Nishida N, Matsuda K, Han K-H, Ahn S H, Matsuura K, Nakamura Y, Tanaka Y, **Mizokami M.**, Tokunaga K.

No association for Chinese hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in Japanese and Korean population APASL2012 : 22nd conference of the Asian Pacific association for the study of the liver Taipei, Taiwan, 2012.02.16-19

Poster.

8. Sugiyama M, Sato S, Tanaka Y, Ito K, Murata K, Masaki N, Nakanishi M, **Mizokami M.**

Core promoter mutations specific for hepatitis B virus genotype D1 regulating viral replication APASL2012 : 22nd conference of the Asian Pacific association for the study of the liver Taipei, Taiwan, 2012.02.16-19

Poster.

9. Sugiyama M, Yoshida M, Hoshi Y, Furui Y, Uchida S, **Mizokami M.**

No infectivity of HBV DNA and HBsAb double-positive sera in uPA/SCID chimeric mouse APASL2012 : 22nd conference of the Asian Pacific association for the study of the liver Taipei, Taiwan, 2012.02.16-19

Poster.

10. Zhou B, Wang Z, Yang J, Sun J, Li H, Tanaka Y, **Mizokami M.**, Hou J.

Novel evidence of HBV recombination in family cluster infections in western China APASL2012 : 22nd conference of the Asian Pacific association for the study of the liver Taipei, Taiwan, 2012.02.16-19

Poster.

11. Kurosaki M, Itakura J, Tsuchiya K, Nakanishi H, Asahina Y, **Mizokami M**, Tanaka Y, Izumi N.

Prediction model of anemia using ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with Pegylated-Interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C.

47th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver, Barcelona, Spain, 2012.04.18-22

Poster.

12. Ando T, Aizaki H, Sugiyama M, **Mizokami M**, Kuroda M, Wakita T.

Independent Evolution of Multi-dominant Viral Genome Species of Hepatitis C Virus.

The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science", 東京, 2012.11.21-22 Session.

13. Korenaga M, Hino K, **Mizokami M**.

Iron Metabolism in Hepatitis C.

The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science", 東京, 2012.11.21-22 Session.

14. Korenaga M, Korenaga K, Nishina S, Tomiyama Y, Hara Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, **Mizokami M**, Hino K.

Anti-interferon- α Neutralizing Antibodies Affect to Viral Responses to Interferon in Patients with Hepatitis C Virus Infection Bearing Interferon Sensitive IL28B SNPs.

The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science", 東京, 2012.11.21-22 Poster.

15. Masaki N, Sugiyama M, Tanaka Y, Shimada N,

Nakamuta M, Izumi N, Watanabe S, Tsubota A,

Mizokami M.

Prospective Multi-center Cohort Study for the Predictive Efficacy of IL28B and ITPA SNPs in Patients with Chronic Hepatitis C Treated by Peginterferon and Ribavirin Therapy.

The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science", 東京, 2012.11.21-22 Poster.

16. Murata K, Sugiyama M, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Kirikae I, Aoki Y, Hiramane S, Matsui T, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, **Mizokami M**.

Different Amount of IFN- λ 3 Determines the Outcome of Peg-IFN/RBV Therapy in HCV Patients.

The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science", 東京, 2012.11.21-22 Poster.

17. Nishida N, Tanaka Y, Sugiyama M, Mawatari Y, Ishii M, Tokunaga K, **Mizokami M**.

Investigating the Novel Host Genetic Factors Associated with Treatment Response for HCV Patients.

The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science", 東京, 2012.11.21-22 Poster.

18. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Hiramatsu N, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, **Mizokami M**, Takehara T.

Human BDCA3+ Dendritic Cells are a Main Producer of IFN- λ and Induce ISGs in Response to Hepatitis C Virus.

The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science", 東京, 2012.11.21-22 Poster

国内学会

1. 松浦健太郎, 田中靖人, 飯尾悦子, 日下部篤宣, 新海登, 宮木知克, 野尻俊輔, 渡邊綱正, 藤原圭, 折戸悦朗, 城卓志, **溝上雅史**.

C型慢性肝炎における臨床背景の違いと治療法選択の現状と展開 IP-10値を含めたPEG-IFN/RBV療法における治療予測因子の検討.

第48回日本肝臓学会総会, 石川、金沢,
2012. 06. 7-8

ワークショップ.

2. 新海登, 田中靖人, 松浦健太郎, **溝上雅史**.
B型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の継続と終了をめぐる B型慢性肝炎患者における核酸アナログ中止症例の検討 中止後長期観察例、プレコア/コアプロモーター変異をふまえて.

第48回日本肝臓学会総会, 石川、金沢,
2012. 06. 7-8

ワークショップ.

3. 杉山真也, 平峯智, 西田奈央, 伊藤清顕, 村田一素, 正木尚彦, 宇都浩文, 井戸章雄, 坪内博仁, **溝上雅史**.

最新の遺伝子研究からみた肝臓病の現状と個別化医療への展望 C型慢性肝炎と自然治癒に関連する第二遺伝要因の探索とその応用.

第48回日本肝臓学会総会, 石川、金沢,
2012. 06. 7-8

ワークショップ.

4. 正木尚彦, 杉山真也, 田中靖人, 伊藤清顕, 村田一素, 青木孝彦, 斉藤紘昭, 松井哲平, 今村雅俊, **溝上雅史**.

C型慢性肝炎における臨床背景の違いと治療法選択の現状と展開 C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法における個別化医療 多施設共同前向き研究からの考察.

第48回日本肝臓学会総会, 石川、金沢,
2012. 06. 7-8

ワークショップ.

5. 村田一素, 杉山真也, **溝上雅史**.

C型肝炎基礎 Toll-like receptor 7 agonist刺激による末梢血リンパ球IFN- λ 3誘導とその臨床的意義.

第48回日本肝臓学会総会, 石川、金沢,
2012. 06. 7-8

ワークショップ.

6. 中村稔, 西田奈央, 川嶋実苗, 田中篤, 中牟田誠, 太田肇, 竿代丈夫, 高野弘嗣, 吉澤要, 小森敦正, 梅村武司, 銭谷幹男, 恩地森一, 橋本悦子, 大平弘正, 山本和秀, 金子周一, 山際訓, 中尾一彦, 市田隆文, 滝川一, 前原喜彦, 上本伸一, 國土典宏, 坪内博仁, **溝上雅史**, 徳永勝士, 中沼安二, 石橋大海.

我が国における自己免疫性肝疾患の現状と展開 日本人原発性胆汁性肝硬変のゲノムワイド関連解析.

第48回日本肝臓学会総会, 2012. 06. 7-8
ワークショップ.

7. 楠本茂, 田中靖人, 田中榮司, **溝上雅史**.

B型肝炎再活性化の現状と今後の展開 リツキシマブ+ステロイド併用悪性リンパ腫治療中のB型肝炎ウイルス再活性化のリスク.

第48回日本肝臓学会総会, 石川、金沢,
2012. 06. 7-8

ワークショップ.

8. 澤井裕美, 西田奈央, 松田浩一, 馬渡頼子, 田中靖人, **溝上雅史**, 徳永勝士.

HBV陽性肝癌における感受性候補SNPの東アジア集団での検証.

第21回日本組織適合性学会大会, 2012. 09. 15

9. 伊藤清顕, 溝上雅史.

Cohort研究からみたウイルス性肝炎の解明 B型慢性肝炎に関する全国調査結果.

第16回日本肝臓学会大会・第54回日本消化器病学会大会・第50回日本消化器がん検診学会大会

(JDDW), 神戸, 2012. 10-11

シンポジウム.

10. 是永匡紹, 村田一素, 溝上雅史.

高齢者のC型肝炎 どう扱うか? 高齢C型慢性肝疾患におけるIL28B測定と治療選択の現状.

第16回日本肝臓学会大会・第54回日本消化器病学会大会・第50回日本消化器がん検診学会大会

(JDDW), 神戸, 2012. 10-11

ワークショップ.

11. 正木尚彦, P. K. S, 溝上雅史.

東アジアにおける肝疾患の問題点と治療の特色

開発途上国ネパールにおけるB型肝炎診療の実態.

第16回日本肝臓学会大会・第54回日本消化器病学会大会 (JDDW), 神戸, 2012. 10-11

パネルディスカッション.

12. 西田奈央, 田中靖人, 澤井裕美, 杉山真也,

馬渡頼子, 徳永勝士, 溝上雅史.

日本人および韓国人におけるB型肝炎慢性化、B型肝炎ウイルス排除を規定するHLA-DP遺伝子の同定.

第16回日本肝臓学会大会 (JDDW), 神戸,

2012. 10-11

ポスターセッション.

13. 村田一素, 杉山真也, 溝上雅史.

C型肝炎治療の最前線 IL28B遺伝子多型による治療効果予測不一致に寄与する宿主因子の検討.

第16回日本肝臓学会大会・第54回日本消化器病学会大会 (JDDW), 神戸, 2012. 10-11

シンポジウム.

14. 楠本茂, 田中靖人, 溝上雅史.

B型肝炎再活性化の予知・予防そして治療 B細胞性リンパ腫治療における、月1回のHBV-DNAモニタリングはHBV再活性化による肝炎発症対策として有用である.

第16回日本肝臓学会大会・第54回日本消化器病学会大会 (JDDW), 神戸, 2012. 10-11

パネルディスカッション.

15. 澤井裕美, 西田奈央, 松田浩一, 馬渡頼子, 田中靖人, 溝上雅史, 徳永勝士.

中国集団におけるB型肝炎由来肝臓感受性SNPの東アジア集団での検証.

第16回日本肝臓学会大会 (JDDW), 神戸,

2012. 10-11

ポスターセッション.

16. 西田奈央, 田中靖人, 澤井裕美, 杉山真也, 馬渡頼子, 徳永勝士, 溝上雅史.

東アジア集団におけるB型肝炎慢性化、HBV排除を規定するHLA-DP遺伝子の同定.

第35回日本分子生物学会, 福岡, 2012. 12. 11-14

ポスター.

17. 馬渡頼子, 西田奈央, 中伊津美, 徳永勝士,

溝上雅史.

DigiTag2法におけるPCRプライマー設計パラメータの検証.

第35回日本分子生物学会, 福岡, 2012. 12. 11-14

ポスター.

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

分担研究者：黒崎 雅之 武蔵野赤十字病院 消化器科 部長

分担研究課題：C 型肝炎薬剤応答性のデータマイニング解析

研究要旨：C型肝炎の標準治療薬はペグインターフェロン・リバビリンとHCV阻害剤を含む3剤併用療法へと移行しつつあり、3剤併用療法の治療効果は、インターフェロン治療に対する反応性により規定される。ペグインターフェロン・リバビリン2剤併用療法において、4週でHCV RNAが2.0Log以上減少すると、2剤併用療法で治療中にHCV RNAが陰性化する確率が95%であることを示した。また、治療開始前にこのような治療反応性を予測する因子として、IL28B、FIB4、GGTが重要であることをデータマイニング解析により明らかとした。貧血を予測するデータマイニング解析では、治療開始前のヘモグロビン値、クレアチニンクリアランス、ITPA遺伝子が有意な貧血予測因子であり、治療中の貧血（ヘモグロビン10g未満）の頻度が19～75%の症例を同定できた。ITPA遺伝子単独では2剤併用療法の治療効果との関連はないが、データマイニングに基づく貧血リスクは、12週以内HCV RNA陰性化症例のSVRと関連する重要な因子であった。

A. 研究目的

ペグインターフェロン・リバビリンとテラプレビルを含む3剤併用療法の効果と、2剤に対する治療反応性は密接に関連する。そこで、2剤に対する治療反応性を規定する因子について、データマイニング解析を行った。また治療中の高度貧血を予測する因子についてのデータマイニング解析を行い、治療効果との関連性も検討した。

B. 研究方法

ペグインターフェロン・リバビリン2剤併用療法で治療中のHCV DynamicsをTaqmanPCR法で評価し、治療反応性とウイルス陰性化との関連を解析した。治療反応性を、治療開始前に予測するアルゴリズムをデータマイニング法で検討した。治

療中の貧血を予測するアルゴリズムをデータマイニング法で解析し、治療効果との関連性を検討した。

C. 研究結果

2剤併用療法により治療中にHCV RNAが陰性化するVirological Response (VR) と早期HCV減衰との関連性を検討したところ、4週間で2.0LogのHCV RNA減衰が得られた場合のVR予測精度は感度85%、特異度83%、PPV95%、NPV58%、AUROC0.931であった。治療開始前に、4週で2.0Logの減衰を予測する因子として、IL28B、FIB4、GGTの3因子が抽出された。IL28BがTTでFIB4が4.45未満の症例は全体の62%を占めるが、これらの症例では94%の確率で4週で2.0Logの減

衰が得られた。一方、IL28B が TG/GG で GGT が 25 以上の症例は全体の 19%を占めるか、これらの症例では 85%の確率で 4 週で 2.0Log の減衰が得られなかった。これら 3 因子の組み合わせで、全体の 81%の症例が、治療反応性が良好、あるいは不良であることを治療開始前に同定できた。

貧血を予測するデータマイニング解析では、治療時開始前の Hb、ITPA、Ccr が有意な因子として抽出された。ITPA が AA/CA で治療開始前 Hb が 14 以上の症例では、貧血発現率がわずか 19%であった。一方、治療開始前 Hb が 14 未満で Ccr が 90 未満、あるいは ITPA が CC の症例では 57-75%の確率で高度貧血が出現した。ITPA 遺伝子単独では、2 剤併用療法の治療効果との関連は見られなかったが、データマイニングによる貧血リスクは SVR と有意な相関を示し、貧血低リスク症例の SVR が 40%に対して、高リスク症例では 28%であった ($p=0.011$)。さらに 12 週以内に HCV RNA が陰性化した症例に限定すると、貧血低リスク症例の SVR が 76%に対して、高リスク症例では 59%であった ($p=0.013$)。貧血のリスクは、総リバビリン投与量と有意な相関関係にあり、貧血リスクが高い症例では総リバビリン投与量の低下により、SVR 率が低下することを示した。

D. 考察

インターフェロン治療反応性を確認することが 3 剤併用療法の治療効果を予測する最も確実な方法であるが、IL28B と検査データの組み合わせで治療反応性を治療開始前に予測することが可能である。ITPA 遺伝子は、貧血リスクと関連し、他の因子と組みあわせることで、総合的な貧血のリスクと治療効果予測に使用できる。

E. 結論

宿主因子と臨床検査データを組み合わせたデータマイニング解析により、抗ウイルス治療に対する反応性、薬剤副作用の可能性などの臨床的に

重要な情報を獲得することが可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) **Kurosaki M**, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Suguchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Yatsuhashi H & Izumi N. Age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antiviral Therapy* 2012;17(1):35-43.
- (2) Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, **Kurosaki M**, Mizokami M & Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2012;42(10):958-965.
- (3) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, **Kurosaki M**, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M & Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East

Asian populations. *BMC Med Genet* 2012; 13:47.

- (4) Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, **Kurosaki M**, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K & Mizokami M. Genome-Wide Association Study Confirming Association of HLA-DP with Protection against Chronic Hepatitis B and Viral Clearance in Japanese and Korean. *PLoS One* 2012; 7:e39175.

- (5) **Kurosaki M**, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N. A model incorporating the *ITPA* genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2013 in press

2. 学会発表

- (1) 欧州肝臓学会 2012 : **Kurosaki M**. et al. Prediction model of anemia using *itpa* genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 24 年度）

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

分担研究者：八橋 弘 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 治療研究部長
研究協力者：橋元 悟 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 肝臓内科

分担研究課題：TVR/PEG-IFN/RBV 療法における治療早期の血中ウイルス量減衰の検討

研究要旨：Telaprevir (TVR) /PEG-IFN/Ribavirin (RBV) 3剤併用療法において、治療早期の血中HCVコア抗原とHCV-RNAの両者を同時に測定し、その減衰をPEG-IFN α /RBV2剤併用療法と比較した。ウイルス量は治療開始時を基準として、その後の減衰量を表記した。3剤では、Pre-Day1-Day3-1Wのウイルス量の減衰が、HCVコア抗原で0(logfmol/L、平均値、以下同)-(-1.77)-(-2.32)-(-2.95)であるのに対して、HCV-RNAで0(logIU/ml、平均値、以下同)-(-3.13)-(-4.03)-(-4.54)とHCV-RNAにおいてより急峻なウイルス減衰を呈した。一方、2剤では、Pre-1W-2Wのウイルス量の減衰が、HCVコア抗原で0(logfmol/L、平均値、以下同)-(-1.0)-(-1.5)であるのに対して、HCV-RNAで0(logIU/ml、平均値、以下同)-(-1.3)-(-1.8)と両測定法間での有意な差は認めなかった。3剤併用療法でのHCV-RNA減衰がより急峻であったのは、Protease阻害薬そのものの機序に起因すると考えられた。

A. 研究目的

1型高ウイルス量のC型慢性肝炎に対する標準治療であるTVR/PEG-IFN/RBV3剤併用療法では、治療早期の急峻な血中ウイルス量減少のために、HCV-RNAが検出感度以下に達するまでの期間が大幅に短縮されたが、HCV-RNAが検出感度以下になるまでのウイルス減衰を明らかにした報告は少ない。そこで、3剤併用療法を施行した症例における治療早期の血中ウイルス量の減衰を明らかにすることを本研究の目的とした。

B. 研究方法

2012年1月～12月の期間、国立病院機構長崎医療センターでGenotype1型C型慢性肝炎に対してTVR/PEG-IFN/RBVを導入した12例を対象とし、

治療早期のウイルス量(HCVコア抗原量、HCV-RNA)の推移を2剤併用療法PEG-IFN α /RBVを施行した32例の推移と比較検討した。

HCVコア抗原は、Abbott社のARCHITECT®(CLIA法、測定範囲3～180,000fmol/L)で、HCV-RNAはRoche社のCOBAS®TaqMan®(Real-time PCR法、測定範囲1.2～7.8logIU/ml)で測定した。

3剤併用療法では、治療前・開始後1日目・3日目・1週目(Pre-Day1-Day3-1W)で、2剤併用療法では、治療前・開始後1週目・2週目(Pre-1W-2W)で、2つの測定系で同時に測定した。

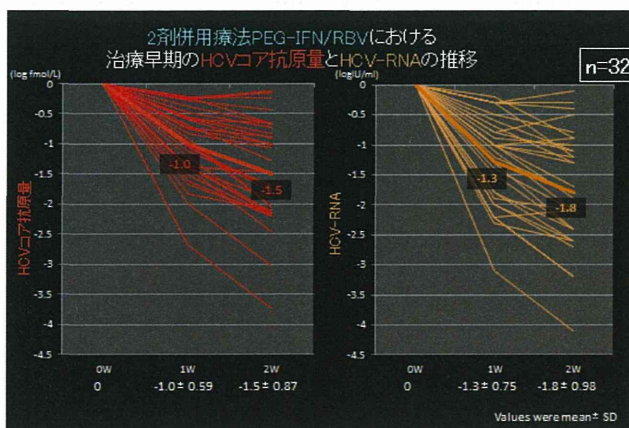
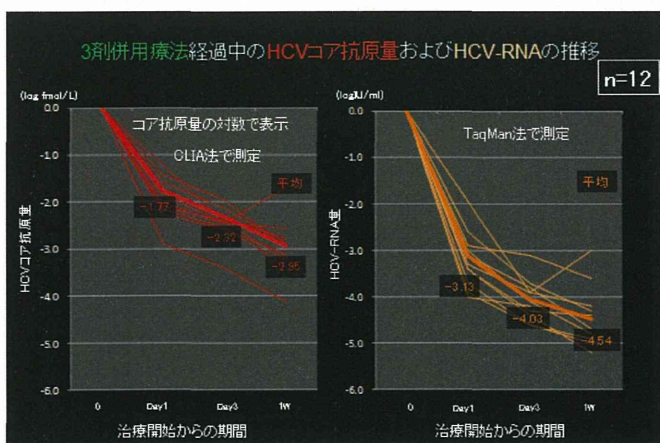
ウイルス量は、両測定系での比較がしやすいようにHCVコア抗原量は対数換算し、治療開始前をゼロ、以後の減衰量をマイナスで表記した。

(倫理面への配慮)

本研究は、「臨床研究に関する倫理指針」(改訂版)を遵守し、当院倫理審査委員会の承認を受けて実施した。検体の採取から診療情報の利用に関しては、患者から書面にてインフォームド・コンセントを得た。検体の処理にあたっては、匿名化し、患者が特定できないようにした。

C. 研究結果

TVR/PEG-IFN/RBV3 剤併用療法では、Pre-Day1-Day3-1Wのウイルス量の減衰が、HCV コア抗原で 0(logfmol/L、平均値、以下同)-(-1.77)-(-2.32)-(-2.95)であるのに対して、HCV-RNA で 0(logIU/ml、平均値、以下同)-(-3.13)-(-4.03)-(-4.54)と HCV-RNA においてより急峻なウイルス減衰を呈した。一方、PEG-IFN α /RBV2 剤併用療法では、Pre-1W-2Wのウイルス量の減衰が、HCV コア抗原で 0(logfmol/L、平均値、以下同)-(-1.0)-(-1.5)であるのに対して、HCV-RNA で 0(logIU/ml、平均値、以下同)-(-1.3)-(-1.8)と両測定法間での有意な差は認めなかった。



D. 考察

TVR/PEG-IFN/RBV3 剤併用療法における治療早期のウイルス減衰について検討した結果、HCV-RNA の減衰は急峻であり、HCV コア抗原量は緩徐であった。PEG-IFN/RBV2 剤併用療法では、両測定間での解離はみられなかった。TVR は HCV の複製を直接阻害することにより抗ウイルス活性を発揮するとされており、3 剤併用療法で解離が見られるのは、Protease 阻害薬そのものの機序に起因するものと考えられた。なお、今回の検討は少数例であるため、今後症例を集積してさらなる検討を行う必要があると考えられた。

E. 結論

TVR/PEG-IFN/RBV3 剤併用療法において、治療早期のウイルス減衰を HCV コア抗原量と HCV-RNA で検討した結果、HCV-RNA で急峻な、HCV コア抗原量で緩徐な減衰を認めた。減衰に解離を生じる原因は、HCV 複製阻害をその機序とする Protease 阻害薬に起因すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsushashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in

human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. Gut. 2012 Nov 7.

2) Tateyama M, Yatsuhashi H, Taura N, Motoyoshi Y, Nagaoka S, Yanagi K, Abiru S, Yano K, Komori A, Migita K, Nakamura M, Nagahama H, Sasaki Y, Miyakawa Y, Ishibashi H.

Alpha-fetoprotein above normal levels as a risk factor for the development of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C virus. J Gastroenterol. 2011 Jan;46(1): 92-100.

2. 学会発表

1) Hashimoto S, Nakao R, Kugiyama Y, Sasaki R, Bekki S, Sung-Kwan Bae, Saeki A, Nagaoka S, Abiru S, Yamasaki K, Komori A, Yatsuhashi H. During the triple therapy with protease inhibitor, the difference of the viral decline between HCV-RNA and HCV core antigen level (Poster presentation). AASLD 2012 Boston, USA, 2012. 11. 9-13

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

分担研究者：渡辺 久剛 山形大学医学部消化器内科学 講師
研究協力者：邵 力 山形大学大学院医学研究科公衆衛生学 助教

分担研究課題：地域コホート研究からみた HCV 感染者の自然史

研究要旨：C 型肝炎高浸淫地域の一般住民コホートにおける HCV 感染者の自然史の一端を明らかにするため、本コホート観察開始から 20 年間に及ぶ HCV 抗体陽性者 1,078 名の ALT 値変動と生命予後を調査した。その結果、20 年間常に ALT 値が 30 IU/L 以下であった HCV 感染住民においては、宿主因子として IL-28B のメジャーホモ型の頻度が高かった。また抗ウイルス治療無治療の HCV 抗体陽性者における生命予後調査の結果、HCV RNA 陽性者では陰性者に比べ、肝疾患関連死の頻度が高かったが、性別による有意差は認めなかった。

A. 研究目的

これまでの班研究において、HCV 感染多発地域における住民コホートをベースとした HCV 感染自然治癒、肝発癌と宿主因子の関連を検討してきた。

平成 24 年度はこの肝炎コホートにおける HCV 抗体陽性者 1,078 名全員を対象に HCV 感染予後調査を行い、過去 20 年間の ALT 値の変動および HCV 感染に関わる生命予後について検討した。

B. 研究方法

C 型肝炎高浸淫地域住民 7,925 名を対象に HCV 抗体検査を行ったところ、HCV 抗体陽性者は 1,078 名（HCV 抗体陽性率 13%）であった。これら 1,078 名について、本コホート開始から 20 年間の ALT 値の変動を継時的に追跡した。

また、関連自治体の協力を得、死亡診断書をも

とにこれら 1,078 名の生命予後調査と死因調査を行った。

C. 研究結果

1991 年のコホート開始から 1995 年までのスクリーニング期において、HCV RNA 陽性であった 600 名の ALT 値をみると、ALT 値 31 IU/L 以上が 181 名（28%）、ALT 値 30 IU/L 以下が 469 名（72%）であった。

ALT 値 30 IU/L 以下の 469 名について、1996 年から 2011 年までの ALT 値を追跡すると、15 年間のうちに ALT 値が 31 IU/L 以上となったのは 117 名（25%）、ALT 値が持続的に 30 IU/L 以下であったのは 352 名（75%）であった。そこで 1991 年から初期 5 年間 ALT 値が正常で、その後 ALT 値の上昇がみられた群と、過去 20 年間一貫して ALT 値 30 IU/L 以下を維持していた群において、

宿主因子 IL-28B の遺伝子多型を調べてみると、ALT 値持続正常群では IL-28B メジャーホモタイプ (T/T) が 299 例 (85%) と、ALT 値上昇群 87 例 (75%) に比し、その頻度が有意に高かった ($P < 0.01$)。

一方、死亡診断書をもとにした生命予後調査の結果、観察開始から平均 17.8 年の追跡では、HCV RNA 陽性者が陰性者に比べ肝疾患関連死の頻度が高かった (13.4% vs. 4.5% ; $P < 0.01$)。しかしながらこれを性別でみてみると、男性が女性より総死亡に占める肝疾患関連死の頻度が高い傾向にあったものの、有意差はみられなかった (12.4% vs. 7.3%)。

D. 考察

30 歳以上 80 歳未満のインターフェロン治療歴のない住民ベースの肝炎コホートにおいて、HCV 抗体陽性者 1,078 名全員を対象に、HCV 感染者の肝機能の推移と生命予後を検討した。

まず、平成 23 年度の当班研究において、本コホートにおける HCV 自然治癒例では AST 値、ALT 値、ZTT 値が低い例が多くみられたことから、ALT 値の 20 年間の推移を検討した。患者コホートとは異なり、肝機能検診受診者を対象としている性質上、採血間隔に限りはあるものの、20 年間の観察期間において、受診者の 59% (352 名/600 名) が ALT 値持続正常を示しており、それらの群では ALT 値変動例に比べ、IL-28B 遺伝子多型のメジャーホモ型が多く見られた。これまでの班研究において、本コホートの HCV 自然治癒例では IL-28B メジャーホモ型が有意に多く見られたことから、HCV 感染住民の持続感染例においては、宿主因子が ALT 値の変動とも関連がある可能性が示唆された。

本コホートにおける HCV 感染と肝疾患関連死との関連を調べるために、HCV 抗体陽性者の死亡原因を調査したところ、HCV RNA 陽性者では有意に肝疾患関連死が多いことが明らかとなり、HCV 感染住民コホート結果からも、ウイルス血症に対する抗ウイルス治療の積極的な導入および定期的なマネージメントの必要性が示唆された。

E. 結論

抗ウイルス治療歴のない HCV 感染地域における肝炎コホートの検討からは、HCV 感染予後解明の一端として、20 年間の ALT 値の推移と宿主因子の関係、および HCV 感染に伴う肝疾患関連死を中心とする生命予後が明らかとなった。今後は線維化を含む病態進展に関わる遺伝的要因を解析することにより、本地域コホートにおける更なる HCV 感染予後の解明に取り組んでいきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang DP, Deng L, Saito T, **Watanabe H**, Kawata S, Aoki C, Hotta H: A point mutation at Asn-534 that disrupts a conserved N-Glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. *J Med Virol* 84: 229-234, 2012.

2. **渡辺久剛**、斎藤貴史、河田純男：肝炎コホートにおける HCV 自然治癒および肝発癌関連因子から見た C 型慢性肝炎に対する個別化医療の可能性. *消化器内科* 55 (2) : 248-252, 2012.

2. 学会発表

1. **Watanabe H**, Saito T, Katsumi T, Tomita K, Sato